



¹ Dra. Inês Almeida
² Prof. Dr. Fernando Almeida

O USO DE CÉLULAS ESTAMINAIS DA POLPA DENTÁRIA DECÍDUA – UMA REVISÃO DA LITERATURA

Introdução

Células estaminais (CsE) são células indiferenciadas, pluripotenciais, que podem dividir-se e multiplicar-se por um longo período de tempo, diferenciando-se numa série diversificada de tipos e tecidos especializados de células^{1,2}.

Em relação à origem, as CsE podem ser classificadas em células estaminais embrionárias (CsEE) e células estaminais adultas (CsEA)². As CsEE são derivadas da massa celular interna do blastocisto e formam todos os tipos de células, sendo, portanto, pluripotentes².

Por outro lado, as CsEA estão presentes em vários tecidos pós-natais e são responsáveis pela renovação normal do tecido, bem como pela regeneração e cicatrização após lesões². As células estaminais mesenquimais (CsEM) constituem um tipo de CsEA². Desde que foram descritas pela primeira vez em 1966, o interesse clínico e biológico nas CsEM aumentou e foram propostos critérios mínimos para a identificação das mesmas: aderência a superfícies de cultura plástica, potencial de diferenciação osteogénica, adipogénica e condrogénica *in vitro*, bem como expressão de determinados antígenos de superfície e ausência de expressão de certos marcadores hematopoiéticos e endoteliais e do antígeno leucocitário humano-DR².

As CsEM podem ser isoladas de diferentes locais, como a partir da medula óssea, do cordão umbilical, da placenta e dos tecidos adiposo e dentário².

As células estaminais dentárias (CsED) têm ganho destaque nos últimos anos devido à sua acessibilidade, plasticidade e potencial de diferenciação³. Tem havido, portanto, um interesse crescente no seu uso na medicina regenerativa para o tratamento de várias doenças humanas². Vários tipos de CsED humanas foram identificados, incluindo as do ligamento periodontal, dos folículos dentários de terceiros molares, da polpa dentária de dentes permanentes e da polpa dentária de dentes decíduos esfoliados³ (Figura 1).

Objectivos

Realizar uma revisão da literatura científica atual sobre a utilização de células estaminais da polpa dentária decídua, as suas técnicas de recolha, isolamento e armazenamento, as suas aplicações e limitações, bem como as perspectivas existentes de desenvolvimento e investigação nesta área.

Metodologia de pesquisa

Para a elaboração da presente revisão, realizou-se uma pesquisa de artigos científicos recorrendo ao motor de busca Google Academics e às bases de dados eletrónicas B-on e MEDLINE/PubMed. Foram utilizadas as palavras-chave “stem



Fig. 1. Desenho esquemático que ilustra fontes de CsEM derivadas de tecido dentário humano. Abreviaturas: ABMSCs (células estaminais mesenquimais derivadas de ossos alveolares); DFPCs (células progenitoras do folículo dentário); DPSCs (células estaminais da polpa dentária); GMSCs (células estaminais mesenquimais derivadas de gengiva); PDLSCs (células estaminais do ligamento periodontal); SCAP (células estaminais da papila apical); SHED (células estaminais de dentes decíduos esfoliados); TGPCs (células progenitoras do gérmen dentário). (Fonte: Liu J, et al. Concise Reviews: Characteristics and Potential Applications of Human Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. AlphaMed Press. 2014. 627-638.)

cells”, “dental pulp” e “deciduous teeth”. A pesquisa foi limitada a artigos publicados em língua inglesa, espanhola e portuguesa até março de 2021. Foi ainda feita uma pesquisa no site da American Academy of Pediatric Dentistry (AAPD).

Resultados

1. Células Estaminais de Dentes Decíduos Humanos Esfoliados (SHED – Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth)

As SHED foram obtidas pela primeira vez por Miura e colaboradores, em 2003, e são encontradas na polpa dentária de dentes decíduos, apresentando-se como células dentárias imaturas, não especializadas e capazes de se transformar em tipos de células especializadas por um processo conhecido como diferenciação^{2,4,5}. Estas células surgem na 6ª semana de desenvolvimento humano embrionário, a partir de células da crista neural, e a comunidade científica acredita que o seu comportamento difere do das células estaminais pós-natais^{4,6}.

Semelhantes às CsEM, as SHED exibem morfologia semelhante a fibroblastos, aderem à superfície de cultura de tecidos plásticos, expressam marcadores de superfície de CsEM e têm capacidade de diferenciação multipotencial⁷.

Em comparação às células estaminais da polpa dentária

de dentes permanentes, as SHED apresentam maior taxa de proliferação celular, menor tempo de duplicação da população e maior potencial clonogénico, sugerindo serem menos maduras e, portanto, possuírem o potencial de se desenvolverem numa variedade mais ampla de tipos de tecido^{2,4}. A maior taxa de proliferação verificada nas SHED pode dever-se à alta expressão de genes relacionados com a proliferação celular e matriz extracelular nestas células em comparação com células estaminais da polpa dentária de dentes permanentes⁷.

As SHED são capazes de se diferenciar em adipócitos, condroblastos, osteoblastos, odontoblastos, células musculares e linhas celulares neurais, *in vitro*². *In vivo*, não se diferenciam diretamente em células osteogénicas, mas induzem a formação óssea, além de formarem neurónios, adipócitos, odontoblastos, de auxiliarem no processo de angiogénese e de orientarem a erupção dos dentes permanentes^{2,4}.

2. Recolha e Isolamento de SHED

A técnica de recolha e isolamento de SHED é simples e não invasiva, sendo indolor para o paciente pediátrico^{4,8}. As crianças perdem os dentes decíduos, o que cria a oportunidade para recuperar e armazenar esta fonte de células estaminais⁶. Contudo, nem todos os dentes têm o mesmo potencial para recolha de SHED⁴.

2.1. Critérios para a eleição de dentes candidatos à recolha de SHED

Os dentes, principalmente incisivos e caninos decíduos sem patologia e pelo menos com um terço da raiz restante, contêm este tipo único de células em número suficiente⁴. Dentes decíduos para distal do canino não são, geralmente, recomendados para o efeito⁴.

Os molares decíduos têm uma base radicular mais ampla e, portanto, são retidos na cavidade oral por um período maior em comparação aos dentes anteriores⁴. A erupção dos dentes permanentes posteriores geralmente leva mais tempo para reabsorver as raízes molares primárias, o que pode resultar numa câmara pulpar obliterada que não contém polpa e, portanto, sem células estaminais⁴. Em alguns casos, a remoção precoce de molares decíduos por considerações ortodônticas (por exemplo, intervenção precoce para manuseio do espaço) apresentará uma oportunidade para recolher estes dentes para o banco de células estaminais⁴.

Uma proporção dos dentes decíduos extraídos apresenta lesões de cárie e, portanto, são dentes infectados por bactérias. Os bancos de dentes estão divididos quanto à aceitação de dentes cariados e a literatura científica está dividida de forma semelhante. Werle et al. demonstraram que as CsE extraídas de dentes decíduos cariados e saudáveis demonstraram capacidade equivalente para diferenciação de tecidos. De maneira semelhante, Tsai et al. compararam a eficiência da recuperação de SHEDs na ausência ou presença de cárie, concluindo que as CsE podem ser isoladas de dentes cariados, mas numa quantidade inversa à gravidade clínica da cárie. Foi demonstrada uma diferença superior a quatro vezes no isolamento bem-sucedido de CsE de dentes saudáveis e dentes cariados. Em contraste, Werle et al. observaram apenas uma diferença de 10% no isolamento bem-sucedido de CsE de dentes cariados versus dentes saudáveis. Relativamente a CsE recolhidas de dentes cariados é razoável ser-se cauteloso no mínimo, havendo escassez de informações sobre estes dentes como fonte de CsE armazenadas⁹.

2.2. Recolha de Dentes⁴

Após decisão dos pais do paciente, os dentes, que preenchem os critérios de elegibilidade acima descritos, são colocados numa solução salina estéril e o banco de armazenamento de dentes é contactado.

O dente esfoliado deve apresentar uma polpa vermelha, indicando que a polpa recebeu fluxo sanguíneo até ao momento da remoção, o que é indicativo de viabilidade celular. Se a polpa é de cor cinza, é provável que o fluxo sanguíneo para a polpa tenha sido comprometido e, portanto, as células estaminais estão provavelmente necróticas e não são viáveis para recuperação. É por isso que a recuperação de células estaminais de dentes decíduos é preferida após uma exodontia do que após a esfoliação natural⁴.

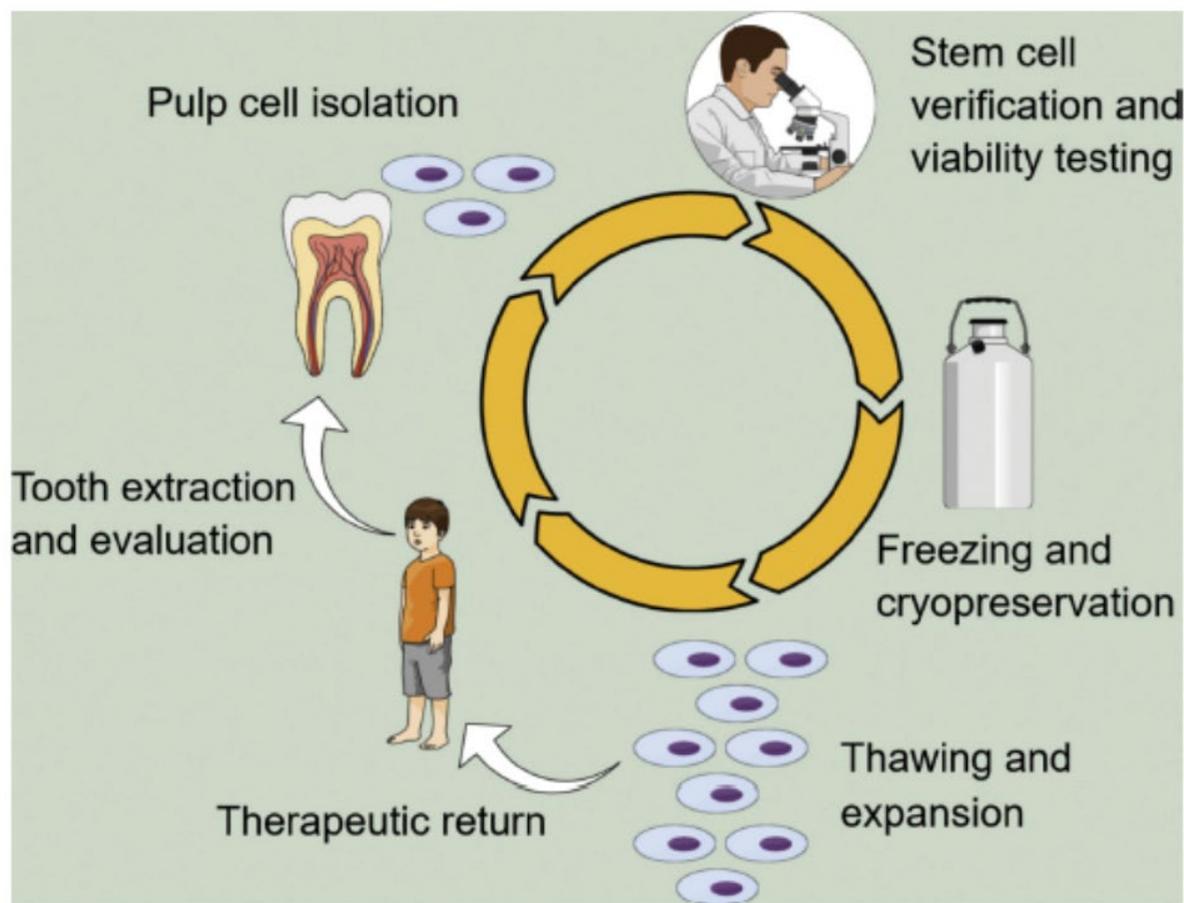


Fig. 2. Representação esquemática do processo de armazenamento de CsED. Dentes perdidos por esfoliação, avulsão ou extração são preservados num meio de transporte. A polpa dentária é removida e as CsE são isoladas, testadas para vários parâmetros, incluindo viabilidade, e depois congeladas. As CsE congeladas são finalmente armazenadas em nitrogénio líquido até que sejam solicitadas pelo doador. Nesse momento, eles podem ser descongelados e cultivadas num número de células terapêuticamente apropriado antes de retornar ao doador (Fonte: Zeitlin B. Banking on teeth - Stem cells and the dental office. Biomedical Journal. 2020. 43: 124-133.).

No caso de um procedimento agendado, o médico dentista avalia visualmente o dente recém-extraído para confirmar a presença de tecido pulpar saudável e o dente ou os dentes são transferidos para um frasco que contém uma solução salina tamponada com fosfato hipotónico, que fornece nutrientes e previne que o tecido seque durante o transporte⁴ (Figura 2). Várias outras soluções, como leite de vaca, têm sido estudadas para o transporte deste tipo de amostra, no entanto, a maioria dos bancos requer os seus próprios kits de transporte de modo a manter a consistência na preservação do dente⁹.

A viabilidade das células estaminais é sensível ao tempo e à temperatura e é necessária uma atenção cuidadosa para garantir que a amostra permanece viável. O tempo desde a colheita até à chegada às instalações de armazenamento não deve exceder as 40 horas⁴. Contudo, Perry et al. estudaram o impacto do tempo entre a recolha e o processamento da amostra e foram capazes de obter células para cultivo até 120 horas após a extração. Tal sugere que o processamen-

to imediato pós-extração não é um fator crucial necessário para armazenar CsE com eficácia¹⁰.

2.3. Isolamento de SHED⁴

Quando o banco de dentes recebe o frasco, é seguido o seguinte protocolo:

- A superfície do dente é limpa por três vezes com solução salina fosfatada tamponada de Dulbecco sem Ca²⁺ e Mg²⁺ (PBSA) e a desinfecção é feita com um reagente de desinfecção, como iodopovidona, sendo o dente novamente lavado com PBSA.

- O tecido pulpar é isolado da câmara pulpar com uma pinça estéril ou um escavador de dentina e é colocado numa placa de Petri estéril, lavada por três vezes com PBSA.

- O tecido é então digerido com colagenase tipo I e dispa-se, por 1 hora a 37°C e as células isoladas são passadas através de um filtro de 70 µm para obter suspensões de células únicas.

• Em seguida, as células são cultivadas num meio de CsEM, que consiste num meio essencial mínimo alfa modificado com glutamina 2mM e suplementado com soro bovino fetal (FBS) a 15%, fosfato de ácido ascórbico 0,1Mm L-, 100U/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomomicina a 37°C e 5% de CO2 no ar.

• Colónias isoladas são visíveis após 24 horas⁴.

3. Preservação e Armazenamento de SHED

Sabe-se que, em comparação aos bancos de armazenamento de sangue do cordão umbilical, os bancos de armazenamento de SHED representam uma alternativa economicamente mais acessível, com menos de um terço do custo^{4,8}.

Os modos mais utilizados na preservação e armazenamento destas células são a criopreservação e o congelamento magnético.

3.1. Criopreservação⁴

É o processo de preservação de células ou tecidos inteiros, resfriando-os a temperaturas abaixo de zero. As células são preservadas em vapor de nitrogénio líquido a uma temperatura inferior a -150° C. A essas temperaturas de congelamento, a atividade biológica é interrompida, assim como qualquer processo celular que leve à morte celular. As SHED podem ser armazenadas com sucesso a longo prazo por criopreservação, permanecendo viáveis para uso⁴.

3.2. Congelamento Magnético

Esta tecnologia é chamada Cells Alive System (CAS) e explora os fenómenos pouco conhecidos de que a aplicação de um campo magnético fraco à água ou ao tecido celular reduzirá o ponto de congelamento desse corpo até 6 a 7°C⁸. O objetivo é resfriar completamente o tecido sem que ocorra o congelamento, garantindo, assim, a distribuição da baixa temperatura sem os danos na parede celular causados pela expansão do gelo e pela drenagem de nutrientes devido à ação capilar, normalmente causada pelos métodos convencionais de congelamento⁴. Usando a tecnologia CAS, a Universidade de Hiroshima afirma que pode aumentar a taxa de sobrevivência de células nos dentes para 83%, quando comparada a 63% para o nitrogénio líquido⁴.

4. Aplicabilidade das CsED

Embora atualmente não haja tratamentos disponíveis e bem estudados que usem CsED colhidas em humanos, a Academia Americana de Odontopediatria (AAPD) reconhece que esta é uma ciência emergente que pode ter aplicação para cuidados de saúde oral¹.

Investigadores sugeriram, que a polpa dos dentes decíduos esfoliados contém condrócitos, osteoblastos, adipócitos e CsEM4. Todos estes tipos de células possuem um enorme potencial para o tratamento terapêutico das seguintes condições: distúrbios degenerativos neuronais como Alzheimer, Parkinson e ALS (Esclerose Lateral Amiotrófica ou doença de Lou Gehrig); condições cardíacas crónicas, como insuficiência cardíaca congestiva e doença cardíaca isquémica crónica; doença periodontal e desenvolver dentes e ossos de substituição⁴. Uma das potenciais aplicações mais relevantes usan-

do estas células é o tratamento de paralisia devido a lesão medular, que já foi realizada com CsEM de outras fontes⁴.

4.1. Aplicabilidade à Medicina Dentária

Particularizando esta temática para as aplicações na área da Medicina Dentária, o desenvolvimento de um dente é determinado por vários fatores de crescimento e interações complexas que resultam em alterações nas células germinativas dos dentes, levando à diferenciação celular². Esforços têm sido feitos para desenvolver novos dentes a partir de CsED2. Após o transplante subcutâneo de células estaminais da polpa dentária permanente e de SHED para a superfície dorsal de ratos e coelhos imunocomprometidos, foi produzida dentina especializada e composta por células semelhantes a odontoblastos circundando um tecido intersticial semelhante à polpa dentária².

Num ensaio clínico controlado e aleatorizado levado a cabo por Xuan e colaboradores¹¹, no qual foram incluídos 40 pacientes com necrose pulpar após lesões dentárias traumáticas, alocaram-se aleatoriamente 30 pacientes para o grupo de implantação de SHED, referidas no trabalho como hDPSC (human deciduous pulp stem cell), e 10 pacientes para o grupo que recebeu tratamento tradicional de apexificação. Quatro pacientes foram excluídos do grupo hDPSC devido a perda no seguimento (três pacientes) e retrauma do dente tratado (um paciente). Foram examinados 26 pacientes (26 dentes) após o implante de hDPSC e 10 pacientes (10 dentes) após a apexificação. O implante de hDPSC, ao contrário da apexificação, levou à regeneração do tecido pulpar tridimensionalmente, com vasos sanguíneos e nervos sensoriais 12 meses após o tratamento. O implante de hDPSC aumentou o comprimento da raiz (p<0,001) e reduziu a largura do forame apical (p<0,001) em comparação com grupo de apexificação. Para avaliar a segurança do implante de hDPSC, foram acompanhados 20 pacientes implantados do grupo hDPSCs por 24 meses e não se observaram eventos adversos. Este trabalho sugeriu que as hDPSCs (as SHED) são capazes de regenerar na totalidade a polpa dentária e podem ser úteis no tratamento de lesões dentárias devido a trauma¹¹.

A aplicação da terapia com SHED para tratar todas as patologias referidas nesta secção está atualmente a ser realizada por muitos investigadores de instituições em todo o mundo⁴. Ainda há muito caminho a ser percorrido, mas a pesquisa existente mostrou claramente que os dentes decíduos são uma fonte melhor de células estaminais terapêuticas do que os dentes do siso e os dentes extraídos por razões ortodônticas⁴.

5. Limitações

As células estaminais de origem dentária têm múltiplas aplicações, ainda em estudo, e a maioria apenas comprovada em animais. Contudo, também existem certas limitações. O potencial oncogénico destas células deve ser ainda determinado em estudos clínicos a longo prazo⁴. Além disso, e como já referido, a pesquisa existente é maioritariamente em modelos animais e ainda são necessários ensaios em humanos para poder generalizar conclusões⁴.

Outra questão principal a considerar é a dificuldade de identificar, isolar, purificar e cultivar estas células em laboratório, pois são necessárias em grande número para serem usadas terapêuticamente⁴. Por fim, são comparativamente menos potentes que as CsEE⁴.

Conclusão

A AAPD reconhece o campo emergente da medicina regenerativa e incentiva os médicos dentistas a seguir a literatura científica baseada em evidências, a fim de educar os pais sobre a recolha, armazenamento, viabilidade e uso de CsED em relação às terapias regenerativas autólogas. A AAPD também reconhece que as CsED colhidas são uma ciência em crescimento que pode ter aplicação para cuidados de saúde oral, mas atualmente não existem tratamentos disponíveis com um nível de evidência superior usando CsED colhidas em humanos.

O público está cada vez mais consciente desta ciência e cada vez mais pais manifestam interesse em colher e armazenar CsED. Embora as fontes de CsED sejam facilmente acessíveis, estas células devem ser protegidas e armazenadas adequadamente para manterem o potencial de proliferação e diferenciação. Além disso, e como já referido, as CsED colhidas atualmente não são muito estáveis e são conhecidas por formarem tumores *in vivo*. Recomendam-se mais estudos para avaliar a segurança e a eficácia das CsED colhidas antes de iniciar os ensaios clínicos em humanos¹. ■

¹ Mestrado em Medicina Dentária pela Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa (FMDUL). Pós-graduação em Clínica Integrada em Medicina Dentária pela FMDUL. Curso Intensivo de Odontopediatria – do Bebê ao Adolescente (Malo Clinic Lisboa). Participação em diversos seminários e congressos. Aluna do Curso Pós-Graduado de Especialização em Odontopediatria pela FMDUL.

² Phd 2006 FMDUP- Faculdade de Medicina Dentária da universidade do Porto; Administrador da clínica Dentária Infante Sagres, Clínica Dentária dos Carvalhos e da Labdent- Laboratório de Protese Dentária. Orador Convidado de várias Conferências Nacionais e Internacionais, entre as quais: World Conference Nobel Biocare, Las Vegas, Nevada, USA 2007; World Tour Nobel Biocare, Lisboa, Portugal 2008; Autor de vários Artigos Científicos publicados em revistas Nacionais e Internacionais; Coordenador do Curso Privado em Implantologia e Reabilitação Oral, no Porto e Lisboa; Consultor Científico de vários produtos de Implantologia.

Referências Bibliográficas

- 1 – AAPD. Policy on Using Harvested Dental Stem Cells. Oral Health Policies. 2017. 160-161.
- 2 – Almeida P., Cunha K. Dental stem cells and their application in Dentistry: a literature review. Revista Brasileira de Odontologia. 2016. 73(4): 331-335.
- 3 – Motwani B., et al. Stem cells: A new paradigm in dentistry. Journal of Applied Dental and Medical Sciences. 2016. 2(1): 139-145.
- 4 – Arora V, Arora P, Munshi A. Banking Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED): Saving for the Future. The Journal of Clinical Pediatric Dentistry. 2009. 33(4):289-294.
- 5 – Ueda T., et al. Characteristics and Therapeutic Potential of Dental Pulp Stem Cells on Neurodegenerative Diseases. Frontiers in Neuroscience. 2020. 14: 1-7.
- 6 – Nourbakhsh N., et al. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. The international journal of developmental biology. 2011. 55: 189-195.
- 7 – Sukarawan W., Osathanon T. Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: Biology and Therapeutic Potential. Chapter 4: Mesenchymal Stem Cells – Isolation, Characterization and Applications. 2017. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68173>
- 8 – Popuri, S. Concerns of a Pediatric Dentist in Dental Stem Cells: An Overview. The Open Dentistry Journal. 2018. 12: 596-604.
- 9 – Zeitlin, B. Banking on teeth - Stem cells and the dental office. Biomedical Journal. 2020. 43: 124-133.
- 10 – Bates K., Gallicchio V. Dental Stem Cell Banking and Applications of Dental Stem Cells for Regenerative Medicine: A Literature Review. Stem Cell Res. 2020. 1(2)-10.
- 11 – Xuan K., et al. Deciduous autologous tooth stem cells regenerate dental pulp after implantation into injured teeth. Science Translational Medicine. 2018. 10: 1-13.
- 12 – Liu J., et al. Concise Reviews: Characteristics and Potential Applications of Human Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. AlphaMed Press. 2014. 627-638.